

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-211865

(43)Date of publication of application : 23.08.1990

(51)Int.Cl.

C12N 5/06

C12M 3/00

(21)Application number : 01-031844

(71)Applicant : KAO CORP
TOKYO JIYOSHI IKA UNIV

(22)Date of filing : 10.02.1989

(72)Inventor : OKANO MITSUO
KATAOKA KAZUNORI
YAMADA NORIKO
SAKURAI YASUHISA
AMIYA TSUYOSHI
MAMADA AKIRA

(54) SUPPORT MATERIAL FOR CULTURING CELL

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject material capable of readily peeling and recovering cultured and proliferated cells with a temperature change by coating the surface of a support material with a (co)polymer having the upper limit critical dissolution temperature and lower limit dissolution temperature for water within prescribed ranges.

CONSTITUTION: The objective support material for culturing cells obtained by coating the surface thereof with a (co)polymer (e.g. polyN- isopropylacrylamide) having 80-0°C upper limit critical dissolution temperature or lower limit dissolution temperature for water. The objective material treated with the above-mentioned polymer is capable of readily controlling balance in hydrophilicity and hydrophobicity of the support surface simply by changing environmental temperature and recovering proliferated cells merely by changing temperature in a cell peeling and recovering step during and after completing culturing of the cells, peeling the cultured cells and subsequently washing the peeled cultured cells with an isotonic solution, etc.

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-211865

⑬ Int. Cl.³

識別記号

序内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)8月23日

C 12 N 5/06
C 12 M 3/00

8717-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 細胞培養支持体材料

⑯ 特 願 平1-31844

⑰ 出 願 平1(1989)2月10日

⑱ 発 明 者 岡 野 光 夫 千葉県浦安市美浜5-4-808
 ⑱ 発 明 者 片 岡 一 則 千葉県柏市大室1083-4 柏グレイズ141-9
 ⑱ 発 明 者 山 田 則 子 東京都板橋区前野町6-10 前野町ハイム1-601
 ⑱ 発 明 者 横 井 靖 久 東京都杉並区永福3-17-6
 ⑱ 発 明 者 網 屋 敏 之 和歌山県和歌山市舟津町2-11-3 シアアーハイブアル
 ム201号
 ⑱ 発 明 者 遠 田 明 和歌山県和歌山市西浜1450 花王水軒寮
 ⑲ 出 願 人 花 王 株 式 会 社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
 ⑲ 出 願 人 学校法人東京女子医科大学 東京都新宿区河田町8-1
 ⑲ 代 理 人 弁 理 士 青 山 淳 外 2 名

明 細 書

1. 発明の名称

細胞培養支持体材料

2. 特許請求の範囲

1. 水に対する上限昇昇解温度または下限昇昇解温度が30〜80℃の範囲にあるポリマーもしくはコポリマーで表面を被覆した細胞培養支持体材料。

3. 発明の詳細な説明

<従来の技術分野>

本発明は、生物学、医学および免疫学等における細胞培養支持体材料に関するものである。

<従来の技術>

従来、細胞培養は、ガラス表面上あるいは膜との処理を行なった合成高分子の表面上にて行なわれていた。例えば、ポリスチレンを材料とする表面処理、例えば紫外照射、シリコンコーティング等を行なった膜の材料が細胞培養用容器として普及している。従来、このような細胞培養用容器を用いて培養・増殖した細胞は、トリプシンのよ

うな蛋白酶分解酵素や化学薬品により処理することで容易に剥離・回収されていた。しかしながら、上述のような化学薬品処理を施して増殖した細胞を回収する場合、①処理工程が煩雑になり、不純物混入の可能性が多くなること、②増殖した細胞が化学的処理により破壊し細胞本来の機能が損なわれる例があること、等の欠点があった。

<発明が解決しようとする課題>

本発明は、上記のような問題を解決するためになされたものであり、トリプシン、EDTAのような蛋白酶分解酵素、化学薬品処理を要せずに環境温度を安定させることで、培養・増殖させた細胞を支持体表面から剥離・回収が可能となるような細胞培養に使用する材料を提供することを目的とする。

<課題を解決するための手段>

本研究者らは以上のような点を鑑み、鋭意研究を重ねた結果、細胞培養体の表面を水溶性高分子の中でも特に上限昇昇解温度が30〜または下限

特開平2-211845(2)

臨界面溶解温度(水にある物質を混合する時、ある温度では部分的にしか溶かさないため、2相に分かれているが、温度を上げるとまたは下げるとある一定の温度を過ぎると完全に溶解して1層になることがある。温度を上げて完全に溶解し達した際の温度を上限臨界面溶解温度、温度を下げていったときに溶解した場合の温度を下限臨界面溶解温度と言う。)を示すようなポリマーにより調整すること、増殖温度を促さるだけで支持体表面の親水性、疎水性のバランスを容易にコントロールでき、細胞培養中と培養終了後、細胞溶解・回収工程で温度を最適化させると増殖細胞が剥離、引き裂いて等質液まで洗浄することだけで増殖細胞を回収可能であることを見出した。

即ち、本発明は水に対する上限臨界面溶解温度または下限臨界面溶解度が80℃以下の範囲にするポリマーもしくはコポリマーで表面を被覆した細胞培養支持体材料を提出する。

水に対する上限または下限臨界面溶解温度は通常水(イオン交換水または蒸留水)との溶解相図を作

成して求める。水との溶解相図は水と上限または下限臨界面溶解温度を求めたポリマーとの互々の濃度(重量分率、重量分率、モル分率、モル比等)の単位を用いても構わない。)の溶液を調製し、各々の温度を上下させ、①目視により2相分離を認める方法、②増殖タンパク質の検出による方法、③放射光散乱の検出による方法、④透過レーザ光の検出による方法、等一般に知られている方法の何れかを用いて、また、組み合わせて用いて作成される。

濃度を用いられる物質は水溶液中で上限臨界面溶解温度または下限臨界面溶解温度を有する化合物であればすべて用いることができるが、好ましくは80℃以下で、より好ましくは50℃～20℃の上限または下限臨界面溶解温度を有するものである。上限または下限臨界面溶解温度が80℃を越えたと細胞が死滅する可能性があるので好ましくない。また、上限または下限臨界面溶解温度が0℃より近いと一般に細胞増殖速度が極度に低下するが、または細胞が死滅してしまうので、好ましくない。

本発明に用いるポリマーまたはコポリマーは、以下のモノマーの混合または共重合により得られる。使用し得るモノマーは、これらの化合物に限定されるものではないが、例えば、アクリルアミド、メタクリルアミド等の(メタ)アクリルアミド化合物、N-イソプロピル(メタ)アクリルアミド、N-エトキシニル(メタ)アクリルアミド、タラヒドロフルアル(メタ)アクリルアミド等のN-アクリル置換(メタ)アクリルアミド誘導体、N、N-ジメチル(メタ)アクリルアミド、N、N-エチルメチルアクリルアミド等のN、N-ジアルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体、1-(1-オキサ-2-プロペニル)-ビロリン、1-(1-オキサ-2-プロペニル)-ビペリジン、1-(1-オキサ-2-プロペニル)-モルホリン、1-(1-オキサ-2-メチル-2-プロペニル)-ビロリン、1-(1-オキサ-2-メチル-2-プロペニル)-ビペリジン、1-(1-オキサ-2-メチル-2-プロペニル)-モルホリン等のN-ヘテロ環状基置換(メタ)アクリルアミド誘導

体、メチルビニルエーテル等のビニルエーテル誘導体または増殖細胞の性質によって臨界面溶解温度を調節する必要がある場合や、溶解物質と細胞増殖支持体との相互作用を高める被覆が望ましい場合や、細胞増殖時の親水性、疎水性のバランスを調整する等の目的で、上記以外のモノマー類との共重合、ポリマー同士とのグラフトまたは共重合、あるいはポリマー、コポリマーの混合物を用いてもよい。また、ポリマー本来の性質を損なわない範囲で、修飾することも可能である。

また、被覆を施される支持体の材質は従来細胞培養に用いられるガラス、改良ガラス、ポリステレン、ポリメチルメタクリレート等の化合物のみならず、一般に膨張付与が可能である物質、例えば上記以外の高分子化合物、セラミックス金属など全て用いることができる。その形状は、ペトリディッシュに固定されることは無く、プレート、ファイバー、(多孔質)粒子、また、一般に細胞培養等に用いられる容器の形状(フラスコ等)を付与されていても構わない。

特開平2-211865 (3)

支持体への被覆方法は、支持体基材と被覆物質を①化学的な反応によって結合させる方法、②物理的な相互作用を利用する方法、を単独または併用して行うことができる。すなわち、①化学的な反応によって結合させる場合、電子線照射(E_B)、γ線照射、紫外線照射、プラズマ処理、コロナ処理、さらに支持体と被覆材料が適当な反応性官能基を有する場合は、ラジカル反応、アニオン反応、カチオン反応等の一般に用いられる有機反応を用いることができる。②物理的な相互作用による方法としては、被覆材料微粒または支持体との相溶性のよいマトリックスを媒体とし(例えば、支持体を形成するモノマーまたは支持体と相溶性のよいモノマーと被覆材料とのグラフトポリマー、ブロックポリマー等)、塗布、蒸餾等の物理的装置を用いる方法等がある。

また、細胞培養支持体上に培養した細胞を支持体から剥離させ回収するには、上限臨界溶解温度以上もしくは下限臨界溶解温度以下にてこれを剥離し、等浸液等によって洗浄して回収すればよ

い。

本発明の作用をポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを例にとって説明する。ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドは水溶液中で約32℃以下で臨界溶解温度を有することが知られている。例えば、一般に細胞培養用ベトリディッシュ材料として用いられるポリスチレン上でN-イソプロピルアクリルアミドを電子線照射(E_B)により重合を行なうと、下限臨界溶解温度である32℃以上ではポリ-N-イソプロピルアクリルアミドの占有体積は小さくなり、ポリマー中の水分子を排除するため、支持体表面は疎水性を示し、逆に32℃以下ではポリ-N-イソプロピルアクリルアミドの占有体積は大きくなるのでポリマー中の水分子の占める体積分率が上昇するため、支持体表面は親水性を示すようになる。

通常の細胞培養ではトリプシン、EDTA等の蛋白分解酵素、化学薬品で処理することにより培養・増殖後の細胞を支持体表面から剥離・回収するが、上述したような物性を有するポリ-N-イ

ソプロピルアクリルアミドを電子線照射によって表面コーティングされた支持体では、温度を制御することにより支持体表面の親水・疎水性がコントロールでき細胞の細胞培養支持体への接着性が変化する。そのため、温度を変化させるだけで培養・増殖後の細胞を破壊することなく細胞支持体から容易に剥離させ、引き続いて等浸液等によって培養された細胞を洗浄すると回収することが可能である。

この方法によれば、トリプシン、EDTAのような蛋白分解酵素、化学薬品による処理をせずに細胞培養支持体から培養した細胞を容易に回収することができるので、①処理工数が簡略化される、②不純物等の混入の可能性があるなくなる、③処理した細胞が化学的処理により細胞機能が障害される等で細胞本来の機能が損なわれない、等の顕著な特徴を獲得することが可能である。

<実施例>

以下、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1、2、3

細胞支持体基材としてベクトン・ディンソン・ラブウェア(Becton Dickinson Labware)社製ファルコン(FALCON)3601ベトリディッシュを用い、培養する細胞は中大動脈の血管内皮細胞を採用した。(ポリ)N-イソプロピルアクリルアミド(被覆物質)を図-1に示す濃度でイソプロピルアルコールに溶解してベトリディッシュは0.5%増量後、各表-1に示す照射量の電子線を照射することによりベトリディッシュ表面にポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを被覆した。電子線照射終了後、イオン交換水によりベトリディッシュを洗浄し、残存モノマーを取り除きクリーンベンチ内で乾燥して、細胞支持体を得た。

中大動脈の血管内皮細胞の培養は、得られた細胞支持体上に牛胎児血清(FCS)を20%含むDMEM-FCS培養液(DMEM)を添加して37℃で2日間培養中、37℃で行なった。充分細胞が増殖したのを確認後、4℃に冷却し血清

特開平2-211865 (5)

実施例1、2、3、4、5では表-2に示されるように周囲の温度を3℃から4℃に下げることによって接触角が減少しており、これは吸着されたN-イソプロピルアクリルアミドまたはN,N-ジエチルアクリルアミドにより材料表面が親水性から疎水性へと変化していることを示している。このような材料を使用した実施例1、2、3、4、5の場合、表-1に示されるように、培養温度を低下させると付着細胞は培養支持体から良好に剥離し、回収することが可能であった。

一方、表面状態を揃えない場合は表-2に示されるように、周りの温度を下げても接触角はほとんど変化せず材料表面は親水性のままであった。このような材料を使用した比較例1、2、3では表-1に示されるように、培養温度を低下させても付着細胞の剥離現象は観察されなかった。

さらに、細胞回収の際の振盪速度については、表-3に示されるように、実施例6では培養開始時の10倍まで増強させることが可能であるが、比較例4では5倍までしか増強させることがで

きなかった。このことは、本発明の細胞回収細胞は従来のそれよりも振盪速度が小さいことを意味する。

＜発明の効果＞

本発明は、低速振盪という簡便な操作で、不純物を全く混入させることなく、しかも、従来の方法と比較すると細胞損傷を十分に保持しながら、培養・回収の繰り返し操作を行なうことができる。

特許出願人 花 王 株 式 会 社

学校法人 東京女子医科大学

代 理 人 弁 理 士 青 山 昌 博 かき

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

平成 1 年特許権第 31844 号 (特開平
2-21185 号、平成 2 年 8 月 23 日
発行) 公開特許公報 1-2119 号掲載) につ
いては特許法第17条の2の規定による補正があっ
たので下記のとおり掲載する。 1 (1)

Int. Cl.	識別 記号	序内整理番号
C13H 5/06		
C12H 3/00		8717-48

平成 2, 11, 20 発行
手続補正書

平成 2 年 8 月 20 日

特許庁長官様

1. 事件の真実

平成 1 年 特許第 第 031844 号

2. 発明の名称

製造装置支持体材料

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 (091) 花王株式会社

(印1名)

4. 代理人

住所 〒640 大阪府大阪市中央区難波2丁目1番01号
アイン21 810タワー内 電話(06)518-1261

氏名 弁護士 (0214) 岡 山 基

5. 補正命令の日付

日 期 (審判請求と同時)

6. 補正の別表

明細書の「特許請求の範囲」および
「発明の詳細な説明」の欄

2. C. 21.

7. 補正の内容

- (1) 特許請求の範囲を別紙の通り訂正する。
- (2) 明細書第3頁下から5行、「下限」の後に「限界」を挿入する。
- (3) 同第5頁第4行～第6頁第2行、「例えば……誘導体または」あるを「例えば、アクリルアミド、メタクリルアミド等の(メタ)アクリルアミド化合物、N-エチルアクリルアミド(単独重合体の下限臨界溶解温度72℃)、N-ε-プロピルアクリルアミド(同21℃)、N-ε-プロピルメタクリルアミド(同27℃)、N-イソプロピルアクリルアミド(同32℃)、N-イソプロピルメタクリルアミド(同43℃)、N-シクロプロピルアクリルアミド(同45℃)、N-シクロプロピルメタクリルアミド(同60℃)、N-エトキシエチルアクリルアミド(同約35℃)、N-エトキシエチルメタクリルアミド(同約45℃)、N-テトラヒドロフルフリルアクリルアミド(同約28℃)、N-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド(同約35℃)等のN-アルキル置換(メタ)アクリル

- アミド誘導体、N、N-ジメチル(メタ)アクリルアミド、N、N-エチルメチルアクリルアミド(単独重合体の下限臨界溶解温度56℃)、N、N-ジエチルアクリルアミド(同32℃)等のN、N-ジアルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体、更に1-(1-オキシ-2-プロペニル)-ピロリジン(同56℃)、1-(1-オキシ-2-プロペニル)-ピペリジン(同約6℃)、4-(1-オキシ-2-プロペニル)-モルホリン、1-(1-オキシ-2-メチル-2-プロペニル)-ピペリジン、4-(1-オキシ-2-メチル-2-プロペニル)-モルホリン等の置換基を有する(メタ)アクリルアミド誘導体、メチルビニルエーテル(単独重合体の下限臨界溶解温度35℃)等のビニルエーテル誘導体、また」に訂正する。
- (4) 同第5頁第4行、「被覆」とあるを「必要」に訂正する。
- (5) 同第6頁第13行、「化合物」とあるを「物質」に訂正する。

(71) 一/一